

## Conteggio degli eritroblasti con ADVIA2120i in soggetti affetti da talassemia, drepanocitosi e nei neonati

### *Erythroblasts count by ADVIA 2120i in patients with thalassemia and sickle cell disease and in newborns*

Sabrina Buoro · Silvia Pipitone · Anna Benegiamo · Fernanda Pavesi · Daniela Gennari · Cheren Saleri · Rosanna Gustinetti · Paola Dominoni · Anna Falanga · Marina Marchetti · Alberto Crippa · Cosimo Ottomano · Giuseppe Lippi

Ricevuto: 29 novembre 2013 / Accettato: 8 aprile 2014 / Pubblicato online: 29 aprile 2014  
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

**Riassunto** *Premesse.* La presenza di eritroblasti (*nucleated red blood cells*, NRBC) nel sangue periferico (SP) di soggetti talassemici con drepanocitosi e nei neonati è indice di alterata attività eritropoietica: nei primi correla con il fabbisogno trasfusionale e nei secondi con l'indice di mortalità e le complicanze perinatali. Questo studio valuta le performance di ADVIA2120i (Siemens) per il conteggio degli NRBC nei tre gruppi sopra menzionati, accomunati da una potenziale alterata sensibilità delle emazie ai sistemi strumentali di lisi e dalla necessità di un accurato conteggio degli NRBC. Gli autori hanno anche definito e verificato una regola di validazione del conteggio degli NRBC in automazione utile per lo screening dei campioni positivi, migliorando al contempo l'appropriatezza delle revisioni microscopiche. La regola è stata definita in funzione delle performance di ADVIA2120i nei conteggi degli NRBC standard e parziali, ottenuti dai canali di analisi PEROX e BASO, dei valori dell'emoglobina (Hb) e del rapporto emazie microcitiche su ipocromiche (M/I).

*Metodi.* In totale, 187 campioni di SP raccolto in K3EDTA (50 controlli, 26 soggetti con drepanocitosi, 55 con beta-

talassemia trait o major e 56 neonati) sono stati analizzati con ADVIA2120i. I conteggi degli NRBC% standard di ADVIA2120i e quelli parziali dei canali di analisi PEROX e BASO (utilizzati nell'algoritmo di calcolo del conteggio standard: %HISTO, %RESID, %GAUSS e %BAROX) sono stati confrontati con il metodo di riferimento in microscopia ottica (MO) su striscio di SP. La concordanza tra i conteggi manuali e quelli ottenuti in automazione è stata valutata mediante la correlazione di Pearson, la regressione di Passing & Bablok e l'analisi del Bias, mentre l'accuratezza diagnostica è stata valutata con l'analisi delle curve ROC. La regola di screening proposta è stata definita in funzione del risultato del conteggio standard degli NRBC, del valore di Hb, di M/I e della valutazione delle performance analitiche dei diversi conteggi parziali/parametri strumentali.

*Risultati.* Il confronto tra i metodi ha fornito i seguenti risultati: correlazione di Pearson:  $r = 0,98$  [intervallo di confidenza (IC) 95% 0,97–0,98;  $p < 0,0001$ ]; regressione Passing & Bablok:  $y = 1,20x + 0,0$  (rispettivamente con IC 95% 0,95–1,55 e 0,0–0,0); Bias:  $-0,907$  (IC 95%  $-2,47$ – $0,66$ ). Considerando tutti i campioni esaminati, il conteggio ADVIA2120i standard ha un'AUC (*area under curve*) di 0,80, invece nei neonati e nei soggetti con drepanocitosi l'AUC è di 0,66 e nei soggetti con talassemia è di 0,73. Nel gruppo di soggetti talassemici e con drepanocitosi il parametro %BAROX presenta performance diagnostiche migliori rispetto al conteggio standard, con AUC, rispettivamente, di 0,83 e 0,76. La regola di screening proposta evidenzia una significativa concordanza con la revisione microscopica,  $p < 0,0001$  (*Pearson chi square test*).

*Conclusioni.* Nelle tre categorie di soggetti analizzati, il conteggio in automazione con ADVIA2120i deve essere sempre riconfermato con revisione microscopica, in modo partico-

S. Buoro (✉) · C. Saleri · R. Gustinetti · P. Dominoni · A. Crippa  
USC Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera  
Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italia  
e-mail: [sbuoro@hpg23.it](mailto:sbuoro@hpg23.it)

S. Pipitone · A. Benegiamo · F. Pavesi · D. Gennari ·  
C. Ottomano · G. Lippi  
UO Diagnostica Ematochimica, Azienda Ospedaliera  
Universitaria di Parma, Parma, Italia

A. Falanga · M. Marchetti  
USC Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda  
Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italia

lare nei soggetti affetti da emoglobinopatie. La performance diagnostica strumentale può essere migliorata applicando algoritmi più complessi che tengano conto anche dei parametri strumentali/conteggi parziali di calcolo degli NRBC (%BAROX), del valore di Hb e dell'indice M/I.

**Parole chiave** Eritroblasti · ADVIA2120i · Neonati · Drepanocitosi · Talassemia

**Summary** Background. The presence of nucleated red blood cells (NRBC) in peripheral blood of patients with beta-thalassemia or sickle-cell disease in newborns, reveals abnormal activity in bone marrow erythropoiesis. While it is related to transfusional needs in patients with beta-thalassemia or sickle-cell disease, in the latter case instead it is strictly related to mortality index and perinatal complications. This study aims to evaluate NRBC counting performances of the Siemens automated analyzer ADVIA2120i in the above-mentioned three categories of subjects, as they have in common a potential alteration in their red blood cells (RBC) lysis sensitivity and a need for accurate NRBC count. The authors have also defined and verified a validation rule of NRBC count in automation useful for the screening of positive samples while improving the appropriateness of microscopic revisions. The rule has been defined on the performance of ADVIA2120i NRBC standard counts and partial counts (PEROX analysis and BASO analysis channels), hemoglobin (Hb) and the ratio of microcytic hypochromic red blood cells (M/I).

Methods. In total, 187 samples of peripheral blood collected in K3EDTA-coated tubes (50 normal controls, 26 patients with sickle-cell disease, 55 patients with beta-thalassemia and 56 newborns) were analyzed by ADVIA2120i. This NRBC ADVIA2120i standard count and their different instrumental parameters (%HISTO, %RESID, %GAUSS, %BAROX) were compared to the same performed by visual microscopy reference method (MO). Agreement between the average value of the two methods was estimated by means of Pearson's correlation, Passing-Bablok regression and bias analysis, whereas diagnostic accuracy was estimated through ROC curves analysis. The proposed screening rule has been defined according to: NRBC counts standard method and evaluation of analytical performances of different instrumental parameters (%HISTO, %RESID, %GAUSS, %BAROX), Hb value and M/I.

Results. The comparison between the two described methods provided the following results: Pearson's correlation:  $r = 0.98$  (with CI 95% from 0.97 to 0.98  $p < 0.0001$ ); Passing-Bablok regression:  $y = 1.20x + 0.0$  (with CI 95% from 0.95 to 1.55 and from 0.0 to 0.0 respectively); bias  $-0.907$  (CI 95% from  $-2.47$  to  $0.66$ ). NRBC ADVIA2120i standard count in all the samples shows an area under curve (AUC) of 0.80, in newborns and sickle-cell disease patients

AUC is 0.66, while in thalassemic patients AUC is 0.73. The %BAROX index shows better diagnostic performance than ADVIA2120i standard NRBC count in the group of thalassemic and sickle-cell disease patients, with an AUC of 0.83 and 0.76 respectively. The proposed screening rule shows a significative match with the microscopic examination (Pearson's Chi-squared test,  $p < 0.001$ ).

Conclusions. In the three categories of subjects which were examined, we suggest that the NRBC automated count by ADVIA2120i should be confirmed every time by means of visual microscopy, especially in the case of patients with hemoglobinopathy. However, such diagnostic instrumental performance can be improved with the use of more complex algorithms which also should be considered: calculation parameters (%BAROX), Hb value and M/I index.

**Keywords** Erythroblasts · ADVIA2120i · Newborns · Sickle cell disease · Talassemia

## Introduzione

Gli eritroblasti (NRBC) sono i precursori delle emazie normalmente confinati nel midollo osseo. La loro presenza nel sangue periferico (SP) è segno di un'aumentata o alterata attività eritropoietica (eritropoiesi inefficace e/o associata a stress ipossico) [1–9].

Gli NRBC nel SP sono presenti in molte condizioni patologiche e/o parafisiologiche, quali sindromi talassemiche, neoplasie mieloproliferative (in particolare mielofibrosi) e metastasi midollari dei tumori solidi. La presenza di NRBC nel SP può anche essere segno di ematopoiesi extramidollare o di condizione di stress ematopoietico generalizzato, come si può osservare nella setticemia, a seguito di massiccia emorragia e/o grave ipossia [1–9].

Nei soggetti talassemici, il numero di NRBC presente nel SP è indice di eritropoiesi inefficace e può essere utile nel monitoraggio e nell'ottimizzazione della terapia trasfusionale [2].

Nel neonato pre-termine e non, il numero di NRBC e la permanenza degli stessi nel SP correlano direttamente con un aumentato indice di mortalità e complicanze neonatali [4–6]; ugualmente, nei soggetti ricoverati in terapia intensiva il numero di NRBC e la loro permanenza in circolo rappresentano una variabile indipendente direttamente correlata all'indice di mortalità [7, 8].

Nella moderna organizzazione di Laboratorio, il conteggio degli NRBC in MO su striscio di SP è scarsamente applicabile per i tempi richiesti e le risorse necessarie.

Gli analizzatori ematologici di ultima generazione sono dotati di diversi metodi per il conteggio degli NRBC e sono in genere caratterizzati da rapidità e accuratezza delle misure, strettamente dipendenti dalla tecnologia e dal metodo di conteggio adottato [3, 10–13].

I sistemi ADVIA2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA) non hanno un canale di analisi dedicato al conteggio degli NRBC. Il conteggio standard fornito dallo strumento, infatti, è ottenuto da un algoritmo di calcolo che combina una serie di parametri/conteggi ricavati dai canali di analisi PEROX e BASO [14].

Gli NRBC nel canale PEROX sono identificati grazie alle loro caratteristiche nucleari e dimensionali e per l'assenza di attività perossidasi, mentre nel canale BASO in funzione della densità nucleare.

Il sistema ADVIA2120i dal canale PEROX ottiene i seguenti parametri/conteggi degli NRBC per ciascun campione: % Istogramma (%HISTO), % Gaussiano (%GAUSS), % Residuo (%RESID); dal Canale BASO si ottiene un unico parametro: % Barox (%BAROX).

ADVIA2120i fornisce il conteggio di NRBC esprimendo un valore numerico per campioni con 200 o più NRBC/ $\mu\text{L}$  o quando questi sono almeno il 2% in campioni con Leucociti  $\leq 3000/\mu\text{L}$ . In altre condizioni, o quando per l'algoritmo di calcolo applicato non sono rispettate tutte le regole imposte, ADVIA2120i non fornisce un dato numerico del conteggio degli NRBC, ma un valore indeterminato (*blank*). Kratz et al [11] hanno documentato una sensibilità (SN) e una specificità (SPEC), rispettivamente, del 77,3% e del 74,6%, considerando i campioni in revisione microscopica positivi solo per conteggi di NRBC  $> 2\%$ .

In precedenti studi, che hanno confrontato le performance di ADVIA2120i con strumentazioni dotate di canali di conta dedicati alla rilevazione degli NRBC, questo strumento mostra performance meno brillanti [3, 13]. Inoltre, è documentato che talune caratteristiche dei campioni hanno ripercussioni sull'accuratezza di queste misure, come accade quando le emazie presentano un'alterata sensibilità ai sistemi lisanti adottati nei diversi emocitometri. Quest'ultima condizione può essere presente in situazioni sia fisiologiche (per esempio nei neonati) sia patologiche (soggetti affetti da emoglobinopatie o da importanti alterazioni epatiche, con elevata uremia o sottoposti a chemioterapia) [14, 15]. In questi casi gli analizzatori potrebbero conteggiare e classificare erroneamente gli NRBC come leucociti (*white blood cell*, WBC), portando a due possibili conseguenze: la sovrastima dei WBC, la sottostima degli NRBC o entrambe. Nella peggiore delle ipotesi si può arrivare al mancato rilevamento degli NRBC [15].

Questo studio si propone in prima istanza di valutare le performance di conteggio in automazione degli NRBC mediante ADVIA2120i su tre gruppi di soggetti: talassemici (*trait* o *major*), neonati e individui affetti da drepanocitosi, accumulati da una potenziale alterata sensibilità alla lisi delle emazie, ma anche dalla necessità di un accurato conteggio degli NRBC [2–6]; si propone di verificare la possibile applicazione di una regola di validazione, definita dagli autori, del loro conteggio considerando anche il valore di

Hb e del rapporto emazie microcitiche su ipocromiche (M/I) [16, 17]. La nuova regola di validazione ha l'obiettivo di evidenziare i campioni potenzialmente positivi per la presenza degli NRBC nel SP, che altrimenti potrebbero sfuggire, tramite blocco e suggerimento di revisione microscopica degli stessi, migliorando così l'appropriatezza di quest'ultima.

## Materiali e metodi

Sono stati analizzati 187 campioni di SP raccolto in K3EDTA dei seguenti soggetti equamente distribuiti tra i sessi: 50 controlli adulti ritenuti sani (reclutati con il criterio di selezione a priori per assenza di malattie conclamate: valori di emocromo con formula, creatinina, AST, ALT, LDH, glucosio, proteina C reattiva e ferritina entro l'intervallo di riferimento), 26 con drepanocitosi, 55 con beta-talassemia (*trait* o *major*) e 56 neonati con età inferiore alla settimana.

I campioni sono stati analizzati su ADVIA2120i seguendo le specifiche dell'azienda produttrice ed entro 2 ore dal prelievo.

Per ciascun campione è stato prodotto uno striscio di sangue periferico per il conteggio degli NRBC con il metodo di riferimento, rappresentato dal conteggio manuale in MO effettuato da due operatori esperti secondo gli standard del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [18].

Il criterio di positività per la presenza di NRBC nella revisione microscopica è di NRBC  $\geq 1$  su 200 leucociti pari allo 0,5% [19].

I sistemi ADVIA2120i non hanno un canale di analisi dedicato al conteggio degli NRBC. Il conteggio standard fornito dallo strumento è ottenuto da un algoritmo di calcolo che combina i seguenti parametri/conteggi ricavati dai canali di analisi PEROX e BASO [14]. Dal canale PEROX:

- % Istogramma (%HISTO): eventi dell'area NRBC identificabile nella regione perossidasi-negativa, circoscritta tra la regione del *noise* e quella dei linfociti;
- % Gaussiano (%GAUSS): eventi sottratti dalla curva di normalizzazione gaussiana dell'area originariamente definita da HISTO;
- % Residuo (%RESID): si ottiene sottraendo i conteggi degli eventi di piastrine e linfociti a quelli totali nell'area NRBC.

Dal canale BASO si ottiene un unico parametro: % Barox (%BAROX), combinando le informazioni ottenute dal canale PEROX e BASO (sommando rispettivamente i conteggi di neutrofili ed eosinofili e di mononucleati e basofili). Questa somma è sottratta ai leucociti (WBC) ottenuti dal canale BASO (WBCB). Il conteggio NRBC %BAROX è determinato, pertanto, mediante la seguente equazione: NRBC = WBCB - [(# neutrofili + # eosinofili) + (# basofili + # mononucleati)].

Sono stati valutati tutti i parametri sopra elencati utilizzati dallo strumento nell'algoritmo di calcolo per la determinazione degli NRBC.

Il sistema ADVIA2120i nel conteggio standard degli NRBC può fornire un valore numerico o un valore indeterminato (*blank*). I campioni con NRBC indeterminati (*blank*) sono stati esclusi dall'elaborazione del conteggio standard, mentre per i parametri %HISTO, %RESID, %GAUSS e %BAROX sono stati elaborati e valutati i dati di tutti i campioni.

Per la validazione del conteggio in automazione degli NRBC, prima di questo studio, era in uso la regola di screening RULE NRBC OLD. Essa prevedeva il blocco del campione e la revisione microscopica con un valore relativo di NRBC  $\geq 0,1\%$  o = *blank*. Il *cut-off* di 0,1% era stato scelto al fine di ridurre i falsi negativi.

La nuova regola (RULE NRBC NEW) è stata definita in funzione del risultato del conteggio standard degli NRBC, del valore di Hb, del valore di M/I e della valutazione delle performance analitiche dei diversi parametri strumentali (%HISTO, %RESID, %GAUSS e %BAROX).

Le performance ottenute con la/e regola/e RULE NRBC NEW sono state confrontate con quelle delle regola attuale (RULE NRBC OLD).

La concordanza tra la media dei conteggi in MO (ottenuta dai due operatori) e il conteggio ottenuto in automazione con ADVIA2120i è stata valutata con la correlazione di Pearson, la regressione di Passing & Bablok e il Bias.

L'accuratezza diagnostica di ADVIA2120i rispetto alla MO è stata valutata con analisi di curve ROC e sono stati determinati i valori di SN, SPEC e concordanza diagnostica (CD).

Il test di Mann-Whitney è stato applicato per valutare la distribuzione dei valori mediani di Hb e di M/I nelle popolazioni in esame.

Le performance delle regole di validazione del conteggio in automazione degli NRBC rispetto alla MO sono state determinate tramite la valutazione della SN, della SPEC e della CD e il *Pearson chi square test*.

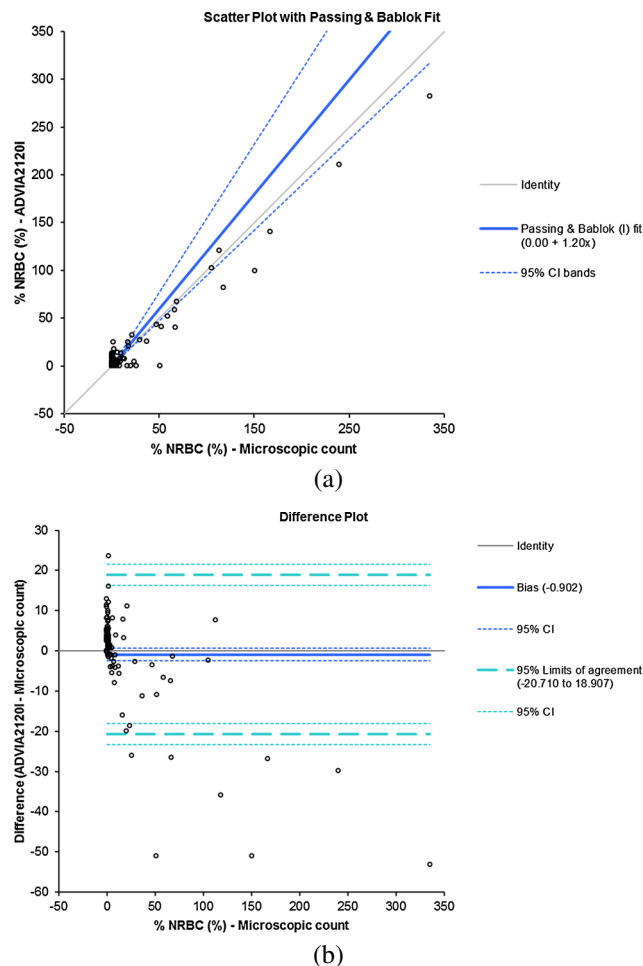
L'analisi statistica è stata condotta con Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK).

Lo studio è stato effettuato in conformità con la Dichiarazione di Helsinki, secondo i termini di tutta la legislazione locale.

## Risultati

### Correlazione

La correlazione del conteggio standard degli NRBC di ADVIA2120i verso il metodo di riferimento in MO è stata valutata su 162 campioni (esclusi i 25 campioni con conteggio degli NRBC standard indeterminato) con percentuale di NRBC in MO compresa fra 0,0% e 335,5%.



**Fig. 1** Correlazione tra ADVIA2120i e MO per il conteggio %NRBC. (a) Regressione Passing-Bablok  $y = 0,0 + 1,20x$  (rispettivamente con IC 95% 0,95–1,55 e 0,0–0,0). (b) Il Bias è di  $-0,907$  (IC 95%  $-2,47$ – $0,66$ )

Il coefficiente di Pearson ha mostrato una  $r = 0,980$  (IC 95% 0,970–0,980;  $p < 0,0001$ ), la regressione Passing & Bablok è  $y = 1,20x + 0,0$  (rispettivamente con IC 95% 0,95–1,55 e 0,0–0,0) e il Bias è di  $-0,907$  (IC 95%  $-2,47$ – $0,66$ ) [Fig. 1].

### Accuratezza diagnostica

In MO sono risultati positivi 93 dei 187 campioni analizzati (49,7%); in dettaglio, 34 (36,5%) tra i soggetti affetti da talassemia, 38 (40,8%) tra i neonati e 21 (22,5%) tra i campioni di soggetti con drepanocitosi. Su ADVIA2120i 25 campioni (pari al 13,4%) sono indeterminati (*blank*) per il conteggio standard e nello specifico sono 9 controlli sani (tutti negativi in MO), 12 soggetti talassemici (di cui 4 positivi in MO), 3 neonati (di cui 1 positivo in MO) e 1 soggetto affetto da drepanocitosi (positivo in MO). Il 24% degli indeterminati (6 su 25) è positivo in MO.

L'analisi della curva ROC per la valutazione delle performance diagnostiche del conteggio standard degli NRBC di

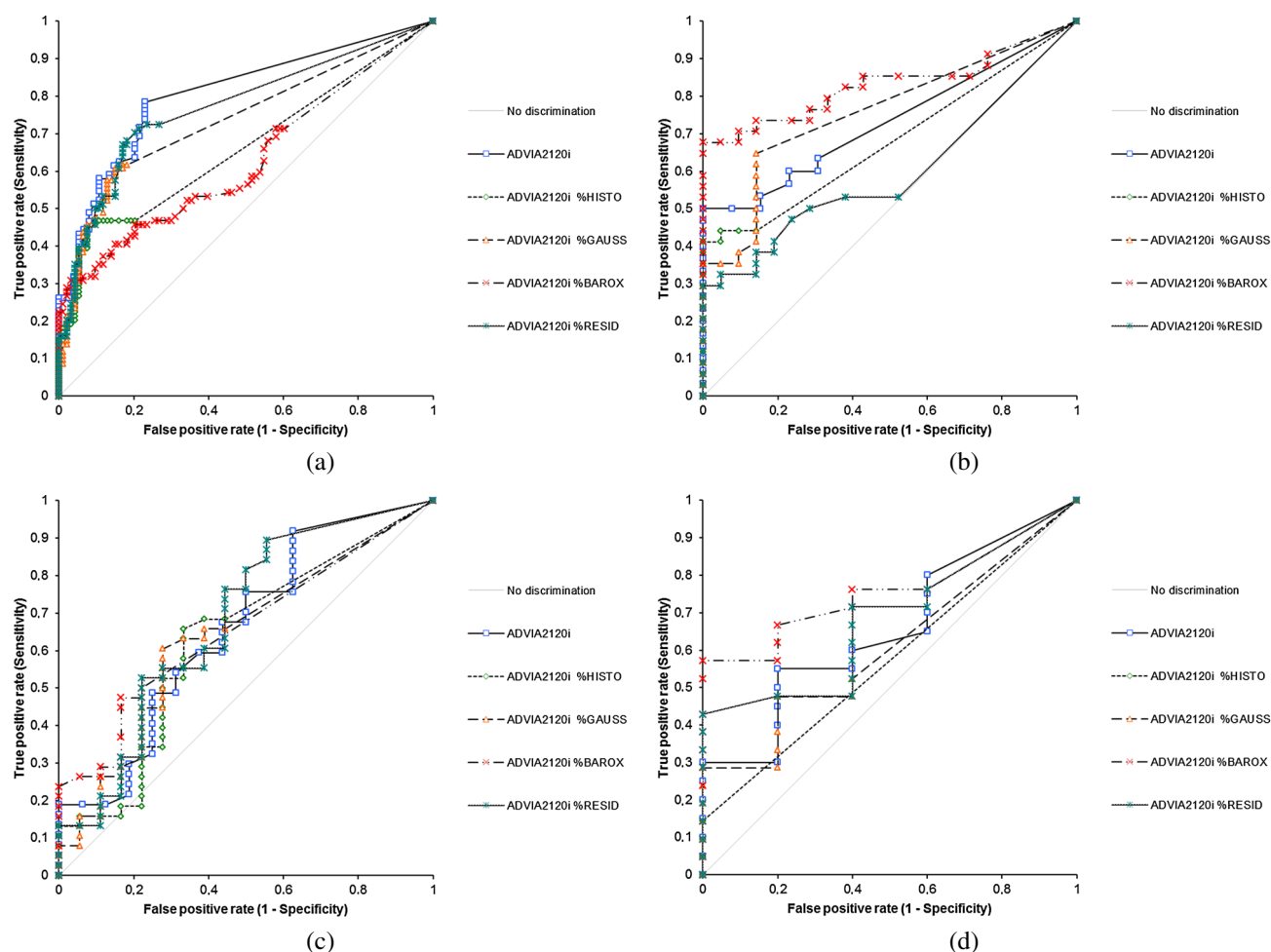


**Tabella 1** Dati delle curve ROC su tutti i campioni analizzati e suddivisi per gruppi

TEST	Tutti i campioni			Talassemici			Neonati			Drepanocitosi		
	AUC	IC 95%	<i>p</i>	AUC	IC 95%	<i>p</i>	AUC	IC 95%	<i>p</i>	AUC	IC 95%	<i>p</i>
<b>Conteggio Standard ADVIA2120i*</b>	0,80	0,74–0,87	<0,0001	0,73	0,60–0,86	0,0003	0,66	0,49–0,82	0,0355	0,66	0,39–0,92	0,1228
<b>%HISTO**</b>	0,66	0,60–0,73	<0,0001	0,68	0,57–0,79	0,0005	0,63	0,47–0,78	0,0583	0,57	0,49–0,65	0,0339
<b>%GAUSS**</b>	0,74	0,67–0,80	<0,0001	0,76	0,65–0,87	<0,0001	0,64	0,49–0,79	0,0386	0,39	0,16–0,63	0,8191
<b>%BAROX**</b>	0,63	0,55–0,71	0,0003	0,83	0,72–0,94	<0,0001	0,65	0,53–0,78	0,0073	0,76	0,57–0,94	0,0033
<b>%RESID**</b>	0,77	0,71–0,83	<0,0001	0,60	0,46–0,74	0,0906	0,68	0,52–0,84	0,0149	0,68	0,45–0,91	0,0636

\* La valutazione è stata effettuata su 162 campioni escludendo i 25 campioni con NRBC = blank

\*\* La valutazione è stata effettuata su 187 campioni



**Fig. 2** Analisi della curva ROC di conteggio standard ADVIA2120i e i conteggi parziali/parametri: %HISTO, %GAUSS, %BAROX, %RESID. (a) Tutti i campioni analizzati. (b) Solo i soggetti talassemici. (c) Solo i neonati. (d) Solo i soggetti affetti da drepanocitosi

ADVIA2120i è stata condotta su tutti i campioni e per gruppi, sempre escludendo quelli in cui il conteggio degli NRBC risultava indeterminato (*blank*).

L'AUC parte da un valore minimo di 0,66 (IC 95% 0,49–0,82;  $p = 0,035$ ) e 0,66 (IC 95% 0,39–0,92;  $p = 0,123$ ),

rispettivamente nei neonati e nei soggetti affetti da drepanocitosi; un valore intermedio di 0,73 (IC 95% 0,66–0,83;  $p < 0,0003$ ) nei soggetti talassemici fino a un massimo di 0,80 (IC 95% 0,66–0,83;  $p < 0,0001$ ) nella valutazione globale dei soggetti analizzati (Tab. 1, Fig. 2).

L'analisi delle curve ROC per la valutazione delle performance diagnostiche degli altri parametri strumentali utilizzati nell'algoritmo di calcolo per la determinazione degli NRBC è stata condotta su tutti i 187 campioni, inclusi quelli in cui il valore degli NRBC risultava indeterminato.

Il parametro %BAROX presenta caratteristiche diagnostiche migliori rispetto al conteggio standard nel gruppo di soggetti talassemici, rispettivamente con AUC 0,83 (IC 95% 0,72–0,94;  $p < 0,0001$ ) vs AUC 0,73 (IC 95% 0,63–0,86;  $p = 0,0003$ ). Nel gruppo di soggetti con drepanocitosi si osserva analogo andamento rispettivamente con AUC 0,76 (IC 95% 0,57–0,94;  $p = 0,0033$ ) vs AUC 0,66 (IC 95% 0,39–0,92  $p = 0,1228$ ). Al contrario, per lo stesso parametro %BAROX, nel gruppo totale dei campioni analizzati e nei neonati si osserva, rispettivamente, AUC 0,63 (IC 95% 0,55–0,71;  $p = 0,0003$ ) vs AUC 0,80 (IC 95% 0,66–0,83;  $p < 0,0001$ ) e AUC 0,65 (IC 95% 0,53–0,78;  $p = 0,0073$ ) vs AUC 0,66 (IC 95% 0,49–0,82;  $p = 0,035$ ) [Tab. 1].

Il parametro %RESID presenta performance migliori, rispetto al conteggio ADVIA2120i standard, nel gruppo dei neonati, rispettivamente con AUC 0,68 (IC 95% 0,52–0,84;  $p = 0,0149$ ) vs AUC 0,66 (IC 95% 0,42–0,82;  $p = 0,0355$ ) [Tab. 1].

Gli altri parametri analizzati %HISTO, %RESID e %GAUSS non evidenziano performance diagnostiche significativamente superiori al conteggio standard ADVIA2120i, come documentato nella Tabella 1.

Il conteggio ADVIA2120i standard alla soglia di %NRBC  $\geq 1,7$ , nel gruppo totale dei 162 campioni analizzati (da cui sono esclusi i 25 campioni con NRBC = *blank*), mostra una CD con MO del 77,8% (17 falsi positivi e 19 falsi negativi) con una SN del 78,4% e una SPEC del 77,0% (Tab. 1); nel gruppo dei talassemici, mostra una CD con MO del 65,1% (4 falsi positivi e 11 falsi negativi) con una SN del 63,3% e una SPEC del 69,3%; nel gruppo dei soli neonati, mostra una CD con MO del 75,5% (10 falsi positivi e 3 falsi negativi) con una SN del 91,9% e una SPEC del 37,5%; nel gruppo dei soggetti affetti da drepanocitosi mostra una CD con MO del 72,3% (3 falsi positivi e 4 falsi negativi) con una SN del 80,0% e una SPEC del 40,0% (Tab. 2). Il 25% (19 su 76) dei campioni negativi al conteggio standard è positivo in MO.

Il parametro %BAROX al *cut-off*  $\geq 2,5\%$  mostra, vs MO nel gruppo totale dei 187 campioni analizzati, una CD pari a 58,8% (32 falsi positivi e 45 falsi negativi), SN del 52,1% e SPEC del 56,7%. Nei soggetti talassemici la CD è pari a 72,7% (9 falsi positivi e 6 falsi negativi), la SN è del 82,9% e la SPEC è del 55,0%. Nei neonati la CD è pari a 48,1% (29 falsi negativi) e la SN è del 23,1%, mentre la SPEC è del 100%. Infine, nei soggetti affetti da drepanocitosi la CD è pari a 61,5% (10 falsi negativi), la SN è del 52,4% e la SPEC del 100% (Tab. 2).

Se si adotta un *cut-off* di %BAROX  $\geq 0,4$ , nel gruppo totale dei 187 campioni analizzati la CD è pari a 56,4% (54 falsi positivi e 27 falsi negativi), la SN è del 71,3% e la SPEC è del 41,9%. Nei soggetti talassemici la CD è pari a 65,5% (3 falsi negativi e 16 falsi positivi), la SN è del 91,2%, la SPEC del 23,8%. Nei neonati la CD è pari a 58,9% (19 falsi negativi e 4 falsi positivi), la SN è del 23,1%, mentre la SPEC è del 100%; infine, nei soggetti affetti da drepanocitosi la CD è pari a 73,1% (5 falsi negativi e 2 falsi positivi), la SN è del 76,0% e la SPEC è del 60,0% (Tab. 2).

Valutazione del rapporto M/I e Hb nei soggetti talassemici, nei neonati e nei soggetti affetti da drepanocitosi

Nel gruppo di controllo, il valore mediano di M/I è pari a 1,00 (IC 95% 0,48–1,67) e quello di Hb è pari a 13,5 g/dL (con IC 95% 12,1–14,2). Nel gruppo dei soggetti talassemici il valore mediano di M/I è pari a 2,27 (IC 95% 1,61–3,0) e quello di Hb è pari a 9,9 g/dL (IC 95% 9,4–10,4). Nel gruppo dei neonati il valore mediano di M/I è pari a 0,25 (IC 95% 0,19–0,39) e quello di Hb è pari a 14,45 g/dL (IC 95% 12,0–17,7). Nei soggetti affetti da drepanocitosi, il valore mediano di M/I è pari a 1,29 (IC 95% 0,97–2,20) e quello di Hb è pari a 9,1 g/dL (IC 95% 8,3–9,7). I valori mediiani di M/I e di Hb dei quattro gruppi in esame differiscono significativamente (Tab. 3).

Regola di screening dei campioni positivi per NRBC

La RULE NRBC NEW è stata definita in funzione del risultato del conteggio standard degli NRBC, del valore di Hb, di M/I e del parametro %BAROX a due differenti *cut-off*:  $\geq 0,4\%$  e  $\geq 2,5\%$ .

La RULE NRBC OLD rispetto alla MO mostra una SN del 79,8%, una SPEC del 60,2% e una CD del 70,1% (con 19 falsi negativi e 37 falsi positivi), con un indice di revisione microscopica pari al 60%. Il *Pearson chi square test* evidenzia discordanza significativa tra la RULE NRBC OLD e la revisione microscopica.

Le RULE NEW BAROX 0,4% e RULE NEW BAROX 2,5%, rispetto al metodo in MO, mostrano, rispettivamente, una SN dell'88,3% e dell'86,1%, una SPEC del 68,8% e del 72,0%, una CD del 78,6% (con 11 falsi negativi e 29 falsi positivi) e del 79,1% (con 13 falsi negativi e 26 falsi positivi); l'indice di revisione microscopica è pari, rispettivamente, al 60% e al 57% (Tab. 4). In entrambi i casi, il *Pearson chi square test* evidenzia una significativa concordanza fra le regole e la revisione microscopica ( $p < 0,0001$ ).

## Discussione

Il conteggio accurato degli NRBC nel SP mostra sempre maggiore importanza, non solo dal punto di vista

**Tabella 2** Analisi delle performance di conteggio standard ADVIA2120i e %BAROX nella determinazioni degli NRBC su tutti i campioni analizzati e suddivisi per gruppi

	Tutti i campioni				Soggetti talassemici				Neonati				Drepanocitosi			
	Tot		Performance		Tot		Performance		Tot		Performance		Tot		Performance	
	MO	Neg	Pos	Neg	MO	Neg	Pos	Neg	MO	Neg	Pos	Neg	MO	Neg	Pos	Neg
<b>% ADVIA 2120i</b>	<b>Cut-off <math>\geq 1,7\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 1,7\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 1,7\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 1,7\%</math></b>			
Pos	69	17	86		19	4	23		33	11	44		16	3	19	
Neg	19	57	66		11	9	20		3	6	9		4	2	6	
Totale	88	74	162		30	13	43		36	17	53		20	5	25	
<b>% BAROX</b>	<b>Cut-off <math>\geq 0,4\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 0,4\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 0,4\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 0,4\%</math></b>			
Pos	67	54	121		31	16	47		19	4	23		16	2	18	
Neg	27	39	56		3	5	8		19	14	33		5	3	8	
Totale	94	93	187		34	21	55		38	18	56		21	5	26	
<b>% BAROX</b>	<b>Cut-off <math>\geq 2,5\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 2,5\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 2,5\%</math></b>				<b>Cut-off <math>\geq 2,5\%</math></b>			
Pos	49	32	81		29	9	38		9	0	9		11	0	11	
Neg	45	61	106		5	12	17		29	18	47		10	5	15	
Totale	94	93	187		34	21	55		38	18	56		21	5	26	

\*Nella valutazione di %ADVIA2120i è stato escluso 25 campioni indeterminati (blank)

\*\*Nella valutazione di %ADVIA2120i è stato escluso 12 campioni indeterminati (blank)

\*\*\*Nella valutazione di %ADVIA2120i è stato escluso 3 campioni indeterminati (blank)

\*\*\*\*\* Nella valutazione di %ADVIA2120i è stato escluso 1 campione indeterminato (blank)

CD, concordanza diagnostica; MO, microscopia ottica; Neg, negativo; NRBC, eritroblasti Pos, positivo; SN, sensibilità; SPEC, specificità; Tot, totale

**Tabella 3** Valore mediano del rapporto M/I e Hb nelle popolazioni studiate

	Valore M/I			Valore Hb g/dL		
	1st Quartile	Mediano (IC 95%)	3rd Quartile	1st Quartile	Mediano (IC 95%)	3rd Quartile
<b>Controlli</b>	0,33	1,00 (0,48–1,67)	2,69	9,20	13,5 (12,00–14,0)	14,7
<b>Talassemia</b>	1,29	2,27* (1,61–3,00)	3,39	9,10	9,9§ (9,4–10,4)	11,1
<b>Neonati</b>	0,16	0,25** (0,19–0,39)	0,59	11,1	14,45§§ (12,0–17,7)	18,5
<b>Drepanocitosi</b>	0,85	1,29*** (0,97–2,20)	3,12	8,2	9,1§§§ (8,3–9,7)	9,8

\*Significativamente diverso con  $p < 0,001$  dal valore mediano del controllo,  $p < 0,0001$  dei neonati e  $p < 0,05$  dei soggetti con drepanocitosi

\*\*Significativamente diverso con  $p < 0,0001$  dal valore mediano del controllo, dei soggetti talassemici e dei soggetti con drepanocitosi

\*\*\*Significativamente diverso con  $p < 0,05$  dal valore mediano dei controlli, dei soggetti talassemici e  $p < 0,0001$  dei neonati

§Significativamente diverso con  $p < 0,0001$  dal valore mediano del controllo, dei neonati e dei soggetti con drepanocitosi

§§Significativamente diverso con  $p < 0,0001$  dal valore mediano dei soggetti talassemici e dei soggetti con drepanocitosi

§§§Significativamente diverso con  $p < 0,0001$  dal valore mediano del controllo e dei neonati e con  $p < 0,05$  dai soggetti talassemici

Hb, emoglobina; IC, intervallo di confidenza; M/I, rapporto emazie microcitiche su ipocromiche

**Tabella 4** Performance del conteggio standard NRBCADVIA 2120i, RULE OLD; RULE NEW BAROX 0,4% e RULE NEW BAROX 2,5%

Tutti i campioni						Soggetti talassemici						Neonati						Drepanocitosi					
MO		Tot	Performance	MO		Tot	Performance	MO		Tot	Performance	MO		Tot	Performance	MO		Tot	Performance				
Pos	Neg			Pos	Neg			Pos	Neg			Pos	Neg			Pos	Neg						
RULE OLD																							
Pos	75	37	112	SN	79,8%	23	12	35	SN	67,6%	35	13	48	SN	92,1%	17	3	20	SN	81,0%			
Neg	19	56	75	SPEC	60,2%	11	9	20	SPEC	42,9%	3	5	8	SP	27,8%	4	2	6	SPEC	40,0%			
Totale	94	93	187	CD	70,1%	34	21	55	CD	58,2%	38	18	56	CD	71,4%	21	5	26	CD	73,1%			
RULE NEW BAROX 0,4%																							
Pos	83	29	112	SN	88,3%	29	13	42	SN	85,3%	35	13	48	SN	92,1%	19	4	23	SN	90,5%			
Neg	11	64	75	SPEC	68,8%	5	8	13	SPEC	38,1%	3	5	8	SPEC	27,8%	2	1	3	SPEC	20,0%			
Totale	94	93	187	CD	78,6%	34	21	55	CD	67,3%	38	18	56	CD	71,4%	21	5	26	CD	76,9%			
RULE NEW BAROX 2,5%																							
Pos	81	26	107	SN	86,2%	28	12	40	SN	82,4%	35	13	48	SN	92,1%	18	2	20	SN	85,7%			
Neg	13	67	80	SPEC	72,0%	6	9	15	SPEC	42,9%	3	5	8	SPEC	27,8%	3	3	6	SPEC	60,0%			
Totale	94	93	187	CD	79,1%	34	21	55	CD	67,3%	38	18	56	CD	71,4%	21	5	26	CD	80,8%			

CD, concordanza diagnostica; MO, microscopia ottica; Neg, negativo; Pos, positivo; SN, sensibilità; SPEC, specificità; Tot, totale

diagnostico, ma anche dal punto di vista prognostico, soprattutto in particolari categorie di soggetti (neonati e pazienti ricoverati nelle unità di terapia intensiva) e nei soggetti talassemici nel monitoraggio e nella valutazione del fabbisogno trasfusionale.

Il conteggio degli NRBC in MO presenta tutti i limiti noti delle procedure manuali, soprattutto l'imprecisione, per le popolazioni rappresentate a bassa e/o bassissima nume-

rosità nello striscio di SP come documentato negli standard CLSI [18].

I limiti di rilevazione, documentati in letteratura per i moderni emocitometri, variano in funzione dell'analizzatore e del metodo adottato per la rilevazione e sono compresi tra 1 e 2 NRBC% [20].

I nostri risultati evidenziano che ADVIA2120i presenta una buona correlazione verso MO nel conteggio degli



NRBC [ $r = 0,980$  (IC 95% 0,97–0,98;  $p < 0,0001$ )], similmente a quanto già documentato da Kratz et al [11], che in particolare avevano riportato un coefficiente di correlazione di  $r = 0,930$ .

L'accuratezza diagnostica del conteggio in automazione degli NRBC per ADVIA2120i mostra caratteristiche diverse in funzione del gruppo di campioni esaminati (Tab. 1).

Nella valutazione globale dei soggetti analizzati, le performance migliori si osservano nel conteggio ADVIA2120i standard con AUC 0,80 (IC 95% 0,66–0,83;  $p < 0,0001$ ) come già confermato peraltro dalla letteratura [3, 13].

Il parametro %BAROX mostra comportamenti migliori di %HISTO, %GAUSS, %RESID e del conteggio ADVIA2120i standard, sia per i soggetti talassemici sia per quelli affetti da drepanocitosi; al contrario, %BAROX mostra limiti di applicabilità nella popolazione generale e nei neonati (Tab. 2 e 3 e Fig. 2).

Al fine di ottimizzare le potenzialità del parametro %BAROX è stata progettata e valutata una regola di screening di validazione complessa (utilizzando due distinti *cut-off*: 0,4% e 2,5% dello stesso) per il conteggio degli NRBC su ADVIA2120i, peculiare per i soggetti talassemici o affetti da drepanocitosi, caratterizzati dal grado di anemia e dalle caratteristiche morfologiche delle emazie evidenziabili con l'indice M/I, già proposto in letteratura come parametro discriminante delle anemie da ferro carentiali dalle emoglobinopatie [15, 16].

In questo studio si evidenzia, infatti, che il valore medio di M/I e Hb in entrambi questi due gruppi di soggetti, rispettivamente, risulta significativamente superiore e inferiore a quello dei campioni di controllo e al gruppo di neonati (Tab. 3).

Le due regole di screening valutate RULE NEW BAROX 0,4% e RULE NEW BAROX 2,5% mostrano performance migliori rispetto alla sola rilevazione del conteggio degli NRBC standard e alla regola RULE OLD (Tab. 4). I campioni risultati falsi negativi presentano tutti "flags morfologici" che inducono comunque alla revisione microscopica.

L'indice di revisione microscopica delle due regole valutate è dello stesso ordine di grandezza della RULE NRBC OLD, ma per quelle nuove la sensibilità di rilevazione dei campioni con l'ottimizzazione dell'organizzazione del lavoro risulta aumentata.

Quando si impiega l'ADVIA2120i in gruppi di soggetti affetti da emopatie quali le alterazioni dell'assetto emoglobinico (drepanocitosi, talassemia), le neoplasie mieloidi o linfoidi o di altra natura, la possibilità di ricorrere ad algoritmi diagnostici che prevedano opportuni reflex test, utili per l'identificazione e il conteggio degli NRBC, comporta una maggiore efficacia diagnostica.

In conclusione, sebbene il conteggio in automazione con ADVIA2120i debba essere in taluni casi riconfermato mediante revisione microscopica, in modo particolare nei sog-

getti affetti da emoglobinopatie, la performance strumentale può essere migliorata applicando algoritmi più complessi che tengano conto anche del parametro/conteggio parziale NRBC %BAROX, del valore di Hb e dell'indice M/I.

**Ringraziamenti** Si ringrazia il Dott. Mauro Vavassori per il contributo nella revisione del manoscritto per la parte in lingua inglese.

**Conflitto di interesse** Nessuno.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## Bibliografia

1. Danise P, Manconi M, Barella F et al (2012) Evaluation of nucleated red blood cells in the peripheral blood of hematological diseases. Clin Chem Lab Med 50:357–360
2. Danise P, Amendola G, Di Concilio R et al (2009) Nucleated red blood cells and soluble transferrin receptor in thalassemia syndromes. Clin Chem Lab Med 47:1539–1542
3. Kwon MJ, Nam MH, Kim SH et al (2011) Evaluation of the nucleated red blood cell count in neonates using the Beckman Coulter UniCel DxH 800 analyzer. Int J Lab Hematol 33:620–628
4. Christensen RD, Henry E, Andres RL, Bennett ST (2011) Reference ranges for blood concentrations of nucleated red blood cells in neonates. Neonatology 99:289–294
5. Kil TH, Han JY, Kim JB et al (2011) A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weight. Korean J Pediatr 54:69–78
6. Li J, Kobata K, Kamei Y et al (2013) Nucleated red blood cell counts: an early predictor of brain injury and 2-year outcome in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy in the era of cooling-based treatment. Brain Dev. doi:10.1016/j.braindev.2013.06.012
7. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T et al (2007) Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. Crit Care 11:R62
8. Sabry A, Allah AA, Salama L (2012) Nucleated red blood cells and eosinopenia as a high risk mortality marker in patients of the intensive care units. Journal of American Science 8:88–95
9. Kuert S, Holland-Letz T, Friese J et al (2011) Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. Clin Chem Lab Med 49:257–263
10. Briggs C (2009) Quality counts: new parameters in blood cell counting. Int J Lab Hematol 31:277–297
11. Kratz A, Maloum K, O'Malley C et al (2006) Enumeration of nucleated red blood cells with the ADVIA 2120 hematology system: an international multicenter clinical trial. Lab Hematol 12:63–70
12. Gulati G, Behling E, Kocher W et al (2007) An evaluation of the performance of Sysmex XE-2100 in enumerating nucleated red cells in peripheral blood. Arch Pathol Lab Med 131:1077–1083
13. Pipitone S, Pavesi F, Testa B et al (2012) Evaluation of automated nucleated red blood cells counting on Sysmex XE5000 and Siemens ADVIA 2120i. Clin Chem Lab Med 50:1857–1859
14. Hematology system NRBC method information software version 5, 4, 6 or higher. Customer customer bulletin ADVIA® 2120 ADVIA® 2120i (2010) 2010-(08):1–18

15. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J et al (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: White blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol* 29:21–41
16. d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM et al (1992) Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and  $\beta$ -thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med* 116:84–89
17. Urrechaga E (2009) Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and  $\beta$ -thalassaemia trait. *Int J Lab Hematol* 31:528–534
18. CLSI (2007) Reference leucocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Approved Standard Second Edition. CLSI document H20-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute
19. Barnes PW, Mcfadden SL, Machin SJ et al (2005) The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 11:83–90
20. Buttarello M, Plebani M (2008) Automated blood cell counts state of the art. *Am J Clin Pathol* 130:104–116